

馬・牛・豚の十二指腸腺の ムコ糖の組織化学

竹花一成*・阿部光雄*

Histochemistry of Mucosaccharides of the Duodenal Glands in the Horse, Cattle and Pig

Kazushige TAKEHANA and Mitsuo ABE

(May, 1980)

緒 論

十二指腸腺は、小腸の粘膜下組織に存在する腺で、「粘膜下組織腺」または、「ブルネル氏腺」と呼ばれている哺乳類特有の外分泌腺である。近年粘液腺の分泌物質の主体であるムコ糖質を組織化学的に検出する方法が急速に進歩した。そのうちで、Spicer¹⁰⁾と山田¹⁴⁾のそれは特にすぐれた方法として一般的に広く応用されている。この方法を用いた十二指腸腺の分泌物質の研究は、馬⁷⁾・猫⁷⁾・フェレット⁸⁾で報告されているが、牛、豚に関しての報告はない。また、組織化学的に、フェレット⁸⁾の十二指腸腺で存在が認められているシアル酸については、馬・牛・豚では、いまだに報告されていない。そこで、本報告では、馬・牛・豚の十二指腸腺の分泌物質の主体であるムコ糖及びシアル酸の存在を組織化学的に比較検討した。

材 料 と 方 法

材料は、すべて屠畜場より入手した消化器に肉眼的に異常がみられない、サラブレッド2歳雌2頭、2.5歳雄1頭、ホルスタイン種2歳去勢5頭、ランドレースとヨークシャーのF₁種0.5歳を用い、1カ所は幽門より後位約10cmの部位と、他の1カ所はその後位の十二指腸腺存在部位との2カ所を採取し、直ちに、1% cetylpyridinium-chloride (CPC)-10% formalin 溶液¹⁾、2% 酢酸カルシウム-10% formalin 溶液¹²⁾の各固定液で、24~48時間固定、アルコール脱水後、パラフィン包埋、6 μ の切片を作製し、以下のような組織化学的諸反応を実施して観察した。

* 獣医学科、家畜解剖学教室

Laboratory of Veterinary Anatomy, Department of Veterinary Medicine, The College of Dairying, Ebetsu, Hokkaido, Japan.

1) 多糖類の検出法

過沃素酸—シッフ反応⁵⁾ (Periodic acid-Schiff reaction ; PAS と略)

2) グリコーゲンの同定法

ジアスターゼ消化試験¹²⁾ (Diastase digestion test ; D-D と略)

3) 酸性ムコ糖の検出法

アルシアンブルー・PAS 法⁶⁾ (Alcian blue-PAS ; AB-PAS と略)

4) 強酸性ムコ糖の検出法

a) アルシアンブルー, pH 1.0 法⁴⁾ (Alcian blue at pH 1.0 ; AB, pH 1.0 と略)

b) アルデハイドフクシン法²⁾ (Aldehyde fuchsin ; AF と略)

c) 高鉄ジアミン法¹¹⁾ (High iron diamine ; HID と略)

5) 弱酸性ムコ糖の検出法

a) アルシアンブルー, pH 2.5 法¹²⁾ (Alcian blue at pH 2.5 ; AB, pH 2.5 と略)

b) 透析鉄法³⁾ (Dialyzed iron-ferrocyanide ; DI-FCY と略)

c) 低鉄ジアミン法¹¹⁾ (Low iron diamine ; LID 法と略)

6) 中性ムコ糖の検出法

a) 過沃素酸酸化 HID 法¹¹⁾ (酸化 HID と略)

b) 過沃素酸酸化 LID 法¹¹⁾ (酸化 LID と略)

7) シアル酸の同定法

シアリダーゼ消化法¹²⁾ (Sialidase digestion test)

成 績

I. 馬

馬の十二指腸腺は、粘液細胞と純漿液細胞より成り、粘液細胞は、PAS 陽性物質を含有していた (Fig. 1)。この物質は、D-D 後の PAS においても反応性は低下しなかった (Fig. 2)。AB-PAS で紫色に染まるので、酸性ムコ糖の存在が確認出来た。強酸性ムコ糖のための、AB, pH 1.0 (Fig. 3), AF, HID で陽性を呈した。弱酸性ムコ糖検出のための、AB, pH 2.5 (Fig. 4), DI-FCY, LID で陽性を呈した。また、中性ムコ糖検出のための、酸化 HID, 酸化 LID で陽性を呈した。シアル酸の検出のための、シアリダーゼ消化試験では、対照に比して AB, pH 2.5 の染色性は低下したが、なお染色性は残存した (Fig. 5)。また、馬の純漿液細胞は、すべて陰性であった。

II. 牛

牛の十二指腸腺は、粘液細胞のみから成り、この細胞は、PAS 陽性物質を腺腔側に有し

た (Fig. 6)。この物質は、D-D 後の PAS においても反応性は低下しなかった (Fig. 7)。AB-PAS で紫色に染まるので、酸性ムコ糖の存在が確認出来た。強酸性ムコ糖検出のための、AB, pH 1.0 (Fig. 8), AF, HID で陽性を呈した。弱酸性ムコ糖検出のための、AB, pH 2.5 (Fig. 9), DI-FCY, LID で陽性を呈した。また、中性ムコ糖検出のための、酸化 HID, 酸化 LID で陽性を呈した。シアリダーゼ消化試験では、対照に比して AB, pH 2.5 の染色性は低下したが、なお染色性は残存した (Fig. 10)。

III. 豚

豚の十二指腸腺は、漿粘液細胞のみから成り、この細胞は、PAS 陽性物質を細胞全体に有した (Fig. 11)。この物質は、D-D 後の PAS においても反応性は低下しなかった (Fig. 12)。AB-PAS で赤色から紫色までの染色性により、酸性ムコ糖の存在が確認出来た。強酸性ムコ糖のための、AB, pH 1.0 (Fig. 13), AF, HID で陰性を呈した。弱酸性ムコ糖検出のための、AB, pH 2.5, DI-FCY では、陰性から陽性までの種々の反応を呈し、LID では、陽性を呈した。中性ムコ糖検出のための、酸化 HID, 酸化 LID では共に陽性を呈した。AB, pH 2.5 で陽性を呈した腺房細胞は、丈の低い円柱状で、核は楕円形で基底に位置し、比較的腺腔は広がった (Fig. 14)。また、陰性を呈した腺房細胞は、ピラミッド状で、核は扁平で、基底に偏在し、腺腔は比較的狭いものが多かった (Fig. 15)。シアリダーゼ消化試験では、AB, pH 2.5 陽性物質は、すべて消化された (Fig. 16)。

以上の観察成績を一括表示すると、Table 1 の如くである。

Table 1. Histochemical reactions of the duodenal glands

Species	Horse		Cattle	Pig
Staining methods	mucous cell	pure serous cell	mucous cell	seromucous cell
PAS	+	—	+	+
PAS after D-D	+	—	+	+
AB, pH 1.0	+	—	+	—
AB, pH 2.5	+	—	+	+ ~ —
AB-PAS	purple	—	purple	red ~ purple
AF	+	—	+	—
DI-FCY	+	—	+	+ ~ —
HID	+	—	+	—
Oxidized HID	+	—	+	+
LID	+	—	+	+
Oxidized LID	+	—	+	+
Sial-AB*	+	—	+	—

* Sial-AB: AB, pH 2.5 after sialidase digestion.

考 察

今回のムコ糖の組織化学的観察において、馬の粘液細胞の分泌物には、Oduor-Okelo⁷⁾の報告と同様、強酸性、弱酸性及び中性ムコ糖を含んでいた。一方、牛・豚の腺細胞の分泌物の組織化学的報告は、現在まで見あたらない。今回の観察では、牛の粘液細胞は、強酸性ムコ糖、弱酸性ムコ糖、中性ムコ糖を含み、豚の漿粘液細胞は、弱酸性ムコ糖、中性ムコ糖を含んでいた。

弱酸性ムコ糖の一物質であるシアル酸の分布は、Warren¹³⁾の総説によると、哺乳類の組織や体液あるいは分泌液中にムコ糖の成分として広く分布するといわれている。しかし、十二指腸腺におけるシアル酸の存在は、Poddar and Jacob⁸⁾が1979年にフェレットで組織化学的に報告しているのみで、家畜では全く報告がない。今回の観察では、馬・牛・豚の十二指腸腺にもシアル酸が存在することが、はじめて確認出来た。

シアル酸は、Golgi 装置で完成された糖蛋白質が、最終の到達場所へ移動するために、糖鎖構造に基づいた仕分けを受け、この仕分けに際して、一度完成した糖鎖が再び分解、再合成という過程を経て、到達場所にふさわしい構造に作り変えられ、最終的に、糖鎖の非還元末端にシアル酸が結合して進行が止まり分泌ムコ糖になる¹⁵⁾。すなわち、シアル酸は物質の安定化のために重要な役割をしている物質と考えられている⁹⁾。シアル酸を含む粘液は、すべて、シアロムチンと呼ばれている¹⁵⁾。したがって、馬・牛・豚の十二指腸腺の分泌物は、シアロムチンである。

本研究で、AB, pH 2.5 の染色性が、馬・牛では、すべて陽性に反応したが、豚では同一腺房内でも陽性または陰性を呈したものがあった。これは、AB, pH 2.5 に反応する弱酸性ムコ糖が豚の場合、馬・牛と異なってシアル酸のみからなるために、シアル酸の遊離の有無で、AB, pH 2.5 に対する反応性が変化したためである。すなわち、分泌物を細胞内に多く含む場合は、シアル酸が糖鎖の末端に結合しているので陰性であり、分泌物をあまり含んでいない場合は、シアル酸が遊離しているために陽性を示したのである。このことは、分泌物が細胞内で、シアル酸の作用でシアロムチンとなって安定化することを示唆する重要な所見であると考ええる。

要 約

馬・牛・豚の十二指腸腺の分泌物、特に糖質についての組織化学的な検索を行ない、次のような結果を得た。

1. 馬・牛の十二指腸腺の粘液細胞は、強酸性ムコ糖、シアル酸とその他の弱酸性ムコ

糖及び中性ムコ糖を含んでいた。

2. 豚の十二指腸腺は、弱酸性ムコ糖及び中性ムコ糖を含んでいた。

3. 豚の弱酸性ムコ糖は、組織化学的にシアル酸のみから成っていた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御協力、御鞭撻をいただいた、酪農学園大学獣医学科岩佐憲二講師、平賀武夫講師に感謝の意を表します。また、研究遂行上、御助言、御協力をいただいた、名古屋大学医学部山田和順助教授、北村裕和助手に深謝します。なお、本論文の要旨は第89回日本獣医学会(1980年3月)で報告した。

文 献

- 1) Conklin, J. L. 1963. Staining reactions of mucopolysaccharides after formalin-containing fixatives. *Staining Technol.*, **38**: 56-59.
- 2) Halmi, N. S. and Davies, J. 1953. Comparison of aldehyde fuchsin staining, metachromasia and periodic acid-Schiff reactivity of various tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, **1**: 447-459.
- 3) Hardin, J. H. and Spicer, S. S. 1971. Ultrastructural localization of dialyzed iron reactive mucosubstance in rabbit heterophils, basophils and eosinophils. *J. Cell Biol.*, **48**: 368-386.
- 4) Lev, R. and Spicer, S. S. 1964. Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.*, **12**: 309-311.
- 5) McManus, J. F. A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Staining Technol.*, **23**: 99-108.
- 6) Mowry, R. W. and Morand, J. C. 1957. Distribution of acid mucopoly-saccharides in normal kidney, as shown by the alcian blue-Feulgen (AB-F) and alcian blue periodic acid Schiff (AB-PAS) stain. *Am. J. Pathol.* **33**: 620-621.
- 7) Oduor-Okelo, D. 1976. Histochemistry of the duodenal glands of the cat and horse. *Acta Anat.*, **94**: 449-456.
- 8) Poddar, S. and Jacob, S. 1979. Mucosubstance histochemistry of Brunner's glands, pyloric glands and duodenal goblet cells in the ferret. *Histochemistry*, **65**: 67-81.
- 9) Sharon, N. 1975. Complex carbohydrates—Their chemistry, biosynthesis, and functions, Addison-Wesley Publishing Co. Inc., Mass.
- (訳書) 大沢利昭, 1975. 複合糖質—構造, 生合成, 機能, 学会出版センター. 東京, 87-94.
- 10) Spicer, S. S. 1960. A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides. *J. Histochem. Cytochem.* **8**: 18-33.
- 11) Spicer, S. S. 1965. Diamine methods for differentiating mucosubstances histochemically. *J. Histochem. Cytochem.*, **13**: 211-234.
- 12) Spicer, S. S., Horn, R. G. and Leppi, T. J. 1967. In the connective tissue, Wagner, B. M. and Smith, D. E. editors, The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 251-303.
- 13) Warren, L. 1963. The distribution of sialic acids in nature. *Comp. Biochem. Physiol.*, **10**: 153-171.
- 14) 山田和順, 1972. ムコ糖の組織細胞化学的研究法. 蛋白質・核酸・酵素, **17**: 775-790.
- 15) 山科都男, 1979. シアル糖蛋白質. 代謝, **16**: 17-23.

Summary

The mucosaccharides of the duodenal glands in the horse, cattle and pig were studied using various histochemical methods.

The results are summarized as follows.

1) The acinar cells in the horse and cattle duodenal glands contained acid mucosaccharides, sulphated acid mucosaccharides, neutral mucosaccharides and sialic acid.

2) In the pig, the acinar cells contained acid mucosaccharides and neutral mucosaccharides.

3) Acid mucosaccharides in the pig consisted of sialic acid alone.

Explanation of Figures

Fig. 1. Duodenal glands in Horse showing PAS-positive mucosaccharides. PAS $\times 480$.

Fig. 2. Duodenal glands in Horse showing PAS-positive mucosaccharides after treatment with diastase. PAS after D-D $\times 480$.

Fig. 3. Duodenal glands in Horse showing AB, pH 1.0-positive mucosaccharides. AB, pH 1.0 $\times 480$.

Fig. 4. Duodenal glands in Horse Showing AB, pH 2.5-positive mucosaccharides. AB, pH 2.5 $\times 480$.

Fig. 5. Duodenal glands in Horse showing AB, pH 2.5-positive mucosaccharides after treatment with nuraminidase (sialidase). $\times 480$.

Fig. 6. Duodenal glands in Cattle showing PAS-positive mucosaccharides. PAS $\times 480$.

Fig. 7. Duodenal glands in Cattle showing PAS-positive mucosaccharides after treatment with diastase. PAS after D-D $\times 480$.

Fig. 8. Duodenal glands in Cattle showing AB, pH 1.0-positive mucosaccharides. AB, pH 1.0 $\times 480$.

Fig. 9. Duodenal glands in Cattle showing AB, pH 2.5-positive mucosaccharides. AB, pH 2.5 $\times 480$.

Fig. 10. Duodenal glands in Cattle showing AB, pH 2.5-positive mucosaccharides after treatment with nuraminidase (sialidase). $\times 480$.

Fig. 11. Duodenal glands in Pig showing PAS-positive mucosaccharides. PAS $\times 480$.

Fig. 12. Duodenal glands in Pig showing PAS-positive mucosaccharides after treatment with diastase. PAS after D-D $\times 480$.

Fig. 13. Duodenal glands in Pig showing AB, pH 1.0-negative mucosaccharides. AB, pH 1.0 $\times 480$.

Fig. 14. Duodenal glands in Pig showing AB, pH 2.5-positive mucosaccharides. Component cells are arranged around a wide lumen. AB, pH 2.5 $\times 480$.

Fig. 15. Duodenal glands in Pig showing AB, pH 2.5-negative mucosaccharides. Component cells are arranged around a narrow lumen. AB, pH 2.5 $\times 480$.

Fig. 16. Duodenal glands in Pig showing AB, pH 2.5-negative mucosaccharides after treatment with nuraminidase (sialidase). $\times 480$.





